

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Docket No: Q76592

OKUDA, Masahiro

Appln. No.: Not Yet Assigned

Group Art Unit: Not Yet Assigned

Confirmation No.: Unknown

Examiner: Not Yet Assigned

Filed: July 21, 2003

For: REAGENT KIT FOR DETECTING LUPUS ANTICOAGULANT

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

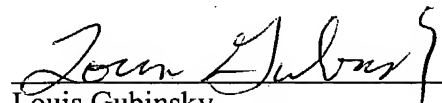
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860


Louis Gubinsky
Registration No. 24,835

WASHINGTON OFFICE



23373

PATENT TRADEMARK OFFICE

Enclosures: Japan 2002-216782
Date: July 21, 2003

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 7月25日

出願番号
Application Number: 特願2002-216782

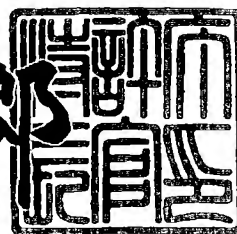
[ST. 10/C]: [JP2002-216782]

出願人
Applicant(s): シスメックス株式会社

2003年 7月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1060

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/86

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号
シスメックス株式会社内

【氏名】 奥田 昌宏

【特許出願人】

【識別番号】 390014960

【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200385

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ループスアンチコアグラントの測定試薬および測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 2 種類の異なる濃度のホスファチジルセリンを、それぞれ別個に少なくとも含んでなる試薬により構成された凝固測定試薬。

【請求項 2】 請求項 1 記載の凝固測定試薬であって、一方の試薬に含まれるホスファチジルセリンの濃度が $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、他方の試薬に含まれるホスファチジルセリンの濃度が $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、且つそれぞれの試薬に含まれるホスファチジルセリンの濃度比が 10 倍乃至 20 倍である凝固測定試薬。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 記載の凝固測定試薬であって、ホスファチジルセリンを含む試薬が、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬、プロトロンビン時間測定試薬、または希釈ラッセル蛇毒測定 (dRVVT) 試薬である凝固測定試薬。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項記載の凝固測定試薬であって、ホスファチジルセリンの他に、ホスファチジルエタノールアミンおよび／またはホスファチジルコリンを含んでなる試薬により構成された凝固測定試薬。

【請求項 5】 請求項 4 記載の凝固測定試薬であって、ホスファチジルエタノールアミンおよび／またはホスファチジルコリンの濃度が $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ である凝固測定試薬。

【請求項 6】 請求項 1 から 5 のいずれか 1 項記載の凝固測定試薬であって、ループスアンチコアグラントの測定に用いる凝固測定試薬。

【請求項 7】 請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載の凝固測定試薬を用いることを特徴とする凝固時間測定方法。

【請求項 8】 請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載の凝固測定試薬を用いることを特徴とするループスアンチコアグラントの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床化学や医薬研究などの分野において用いられる技術に関する。より詳しくは臨床化学の分野において用いられる凝固測定試薬および該凝固測定試薬を用いた血液凝固時間の測定方法、さらに詳しくはループスアンチコアグラントの測定方法および該測定方法に用いる凝固測定試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

ループスアンチコアグラント（以下、LAと略称する）は、自己抗体の1つである抗リン脂質抗体である。LAは不均一な抗体であり、陰性荷電リン脂質と β 2-グリコプロテインI（ β 2-GPI）またはプロトロンビンとの複合体に対する抗体であることが、近年明らかになった。

【0003】

LAはSLE（Systemic Lupus Erythematosus）患者について初めて報告された抗凝血素である。SLEでの発生頻度は5%乃至10%であり、他の自己免疫性疾患、腫瘍性疾患においても検出されることがある。LAは個々の凝固因子活性を抑制することなく、リン脂質依存性の凝固反応を阻害する免疫グロブリンである。血栓症、流早産、血小板減少などの特有な臨床症状を示す抗リン脂質抗体症候群（antiphospholipid syndrome；APS）において、当該抗体が検出される頻度が高い。

【0004】

LAの測定は、古くから凝固止血検査において用いられているリン脂質依存性の検査方法により行なわれてきた。例えば、ウサギ脳由来セファリン、ウシ脳由来セファリン、大豆レシチンなどを用い、高濃度のリン脂質と低濃度のリン脂質により調製された活性化部分トロンボプラスチン時間測定（以下、APTTと略称する）試薬を使用して測定された凝固時間から、ロスナー インデックス（Rosner Index）やループス比（Lupus Ratio）（LR）を算出し、LA陽性率を判定する手法が知られている。市販の凝固測定試薬として、グラディポアLA（Gradipore社；オーストラリア）というラッセル蛇毒法による検査試薬があり、当該試薬においては天然由来リン脂質が用いられている。また、既存の研究報告によれば（V. Chantarangkul, e

t al., Thromb. Res. 1992, 67:355-365; E. Rosner, et al., Thromb. Haemost. 1987, 57:144-149)、ウサギ脳由来リン脂質などによるリン脂質濃度の差を利用して、算術的にLAの検出が行なわれている。別法として、低濃度リン脂質を添加して調製されたAPTT試薬または希釈ラッセル蛇毒測定(dRVVT)試薬を用い、正常血漿と患者血漿を1:1の割合で混合して凝固時間を測定し、患者血漿の凝固時間が正常血漿により補正される度合いを指標にしてLAを検出する混合試験も利用されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

従来行なわれていたリン脂質依存性凝固測定においては、いずれも天然由来リン脂質が用いられ、且つそのリン脂質組成が無調整であった。そのため、当該凝固試験は、総リン脂質濃度に対するリン脂質依存性凝固が測定されるものであり、決して特定のリン脂質依存的な試験方法ではなかった。さらには、天然由来リン脂質の不均一性または抽出変動差が凝固時間に影響を及ぼすという欠点があった。また、上記混合試験においては、ワーファリンやヘパリンなどの抗凝固剤を含有した検体が、LA陽性患者血漿と同様に陽性と判定されるという欠点があった。

【0006】

本発明の目的は、従来法において見られる欠点が解消された簡便で精度の高いリン脂質依存性凝固試験の提供、より詳しくはLAの特異的な測定方法および該測定方法に用いる試薬の提供にある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために精力的に研究を重ねた結果、本発明者は、ホスファチジルセリン(以下、PSと略称する)だけの濃度を高濃度と低濃度の2種類に分別した試薬を調製し、特定のリン脂質であるPS依存的にLAを高感度に検知する方法を見出した。すなわち、本発明の凝固測定試薬は、2種類の異なる濃度のPSを、それぞれ別個に少なくとも含む試薬により構成されることを特徴とす

る。

【0008】

本発明において、一方の試薬に含まれるホスファチジルセリン (PS) の濃度は $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、もう一方の試薬に含まれる PS の濃度は $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。ここで、両試薬に含有される PS 濃度の差は 10 倍乃至 20 倍であることが好ましい。また、PS は合成品、または天然由来の高純度精製されたもの (純度 $> 99\%$) が好ましく用いられる。

【0009】

PS を含む試薬としては、活性化部分トロンボプラスチン時間測定 (APTT) 試薬、プロトロンビン時間測定 (PT) 試薬、または希釈ラッセル蛇毒測定 (dRVVT) 試薬などであって、従来含有されていた組成無調整の天然由来リン脂質の代わりに上記 PS を含む試薬が例示される。しかし、これらに限らず、臨床化学の分野で通常用いられる凝固測定試験で使用される試薬であって、組成無調整の天然由来リン脂質の代わりに PS を含む試薬が使用可能である。

【0010】

上記試薬には、PS の他に、ホスファチジルエタノールアミン (以下、PE と略称する) および/またはホスファチジルコリン (以下、PC と略称する)、並びに緩衝液などを含有させてもよい。含有させる PE および/または PC の濃度はそれぞれ $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ であることが好ましい。緩衝液は、HEPES および TRIS などが例示されるが、これらに限定されない。緩衝液の濃度は、一般的に臨床化学の分野で用いられている濃度であればよく、簡単な繰り返し実験により決定することができる。

【0011】

本発明においては、上記凝固測定試薬を用いた血液凝固時間の測定方法を提供できる。当該方法は、例えば試料を 2 つに分け、高濃度の PS を含む試薬と低濃度の PS を含む試薬をそれぞれに添加し、試料の凝固時間を測定するといった工程を少なくとも含む。凝固時間の測定は、当業者に良く知られた方法により実施

できる。また、自体公知の自動測定装置による測定も適用可能である。試料は、正常血漿または血小板除去正常血漿を用いて、患者血漿と混合したものをを用いる。混合比は、一般的に 4 : 1 乃至 1 : 4 であり、好ましくは 1 : 1 である。

【0012】

上記測定方法により、血液凝固系の異常、例えばリン脂質依存性凝固の異常を検知できる。具体的には、実施例に示したように LA 陽性患者、血液凝固因子欠損患者、ワーファリン投与患者、またはヘパリン投与患者などに由来する試料で凝固時間の延長が認められた。これらから、上記測定方法および上記凝固測定試薬は、血液凝固系の異常を検知するスクリーニング法に利用できる。

【0013】

上記測定方法および上記凝固測定試薬は、特に LA の特異的な測定が可能であるため、LA のスクリーニング法として有用である。LA 陽性患者由来の試料では、高濃度の PS を含む試薬における凝固時間の延長度合いと比較して、低濃度の PS を含む試薬での凝固時間の延長度合いが増加した。一方、血液凝固因子欠損患者、ワーファリン投与患者、またはヘパリン投与患者由来の試料の凝固時間の延長度合いは、高濃度の PS を含む試薬と低濃度の PS を含む試薬とで同程度であった。このように高濃度の PS を含む試薬と低濃度の PS を含む試薬における凝固時間の延長度合いの違いに基いて、LA を特異的に測定することが可能である。

【0014】

LA の判定は、上述のように高濃度の PS を含む試薬における凝固時間の延長と比較して、低濃度の PS を含む試薬での凝固時間の延長度合いが増加することを指標にして行うことができる。より好ましくは、2 種類の異なる濃度の PS を含む試薬を用いて測定されたそれぞれの凝固時間に基いて算出される Rosner Index (E. Rosner, et al., Thromb. Haemast. 1987, 57:144-149) または Lupus Ratio (LR) (R. Schjetlein, et al., Thromb. Res. 1993, 69:239-250) により、判定を行うことができる。

【0015】

従来、L Aが陰性荷電リン脂質であるP Sを中和するために、L Aの存在によりP S依存的な凝固時間が延長されることから、P S依存的な凝固時間を反映する凝固試験がL Aの検出に用いられてきた。しかしながら、従来法では組成無調整の天然由来リン脂質を使用しており、実質的に正確に計量されたP Sを混合した凝固測定試薬を用いてL Aを検知する手法はこれまでに存在しなかった。本発明手法は、従来法と比較して、天然由来リン脂質の不均一性または抽出変動差の凝固時間への影響が解消されており、精度が高く且つ安定して結果が得られるという利点がある。また、本発明手法によれば、ヘパリンなどの抗凝固剤を含有した検体がL A陽性患者血漿と同様に陽性と判定されることがなく、陰性荷電リン脂質であるP S依存的なL Aの反応を、従来法とは格段の差異をもって、特異的に且つ高感度に検知することが可能である。

【0016】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0017】

【実施例1】

エラグ酸溶液(0.1mM)に50mM HEPES緩衝液および25mM TRIS緩衝液を混合し、この溶液に4 μ g/mlのホスファチジルセリン(P S)、50 μ g/mlのホスファチジルエタノールアミン(P E)および70 μ g/mlのホスファチジルコリン(P C)を添加混合したL-APTT試薬と、45 μ g/mlのP S、50 μ g/mlのP Eおよび70 μ g/mlのP Cを添加混合したH-APTT試薬の2種類の試薬を調製した。

【0018】

正常血漿としてコアグトロールNを用いて、L A陽性患者血漿、ワーファリン投与患者血漿、ヘパリン投与患者血漿、または第V I I I因子欠乏患者血漿と、1:1で混合したものを測定試料とした。これらの患者検体は、ジョージキングバイオメディカル社、グラディポア社、A D I社、および国際バイオ社などから購入した。全自動血液凝固分析装置コアグレックス800(島津製作所株式会社

)を用いて、測定回数2回で、これら試料をH-APTT試薬とL-APTT試薬で測定を行った。2種類の試薬を用いてそれぞれ得られた凝固時間から、Lupus Ratio (LR)を算出し、カットオフ値1.05以上をLA陽性と判定した。LRの計算は、文献(R. Schjetlein, et al., Thromb. Res. 1993, 69:239-250)に従い、下式1を用いて行なった。

【0019】

【式1】

$$\text{Lupus Ratio (LR)} = (b/a) / (d/c) = bc/ad$$

ここで、式1中のa、b、c、およびdは、表1に示す組み合わせで得られた測定値を表す。

【0020】

【表1】

	H-APTT	L-APTT
患者血漿と正常血漿1:1混合	a	b
正常プール血漿	c	d

【0021】

その結果、表2に示したように、L-APTT試薬を用いたときに得られたLA陽性患者由来の試料の凝固時間は、H-APTT試薬を用いたときと比較して、延長度合いが増加した。一方、ヘパリン投与患者、ワーファリン投与患者、および第VII因子欠損患者由来の試料の凝固時間は、L-APTT試薬およびH-APTT試薬のいずれを用いたときも同程度の延長度合いを示した。

【0022】

LRのカットオフ値を1.05としたとき、5例のLA陽性患者検体は全て陽性と判定され、ヘパリン投与患者、ワーファリン投与患者、および第VII因子

子欠損患者は全て陰性と判定された。このように、低濃度のPSを含む凝固測定試薬と高濃度のPSを含むものとの2種類の試薬を用いることにより、簡便かつ精度高く、特異的にLAを検出することが可能になった。

【0023】

【表2】

患者試料	H-APTTの 凝固時間 (秒)	L-APTTの 凝固時間 (秒)	Lupus Ratio(LR)	判定 >1.05
正常血漿	30.5	30.3	1.00	—
ヘパリン投与患者	38.2	37.4	0.99	—
ワーファリン患者	31.5	31.2	0.95	—
ワーファリン患者AK-B	30.4	29.3	0.98	—
ワーファリン患者AK-C	32.5	30.6	1.00	—
ワーファリン患者AK-D	35.4	32.6	1.00	—
第Ⅷ因子欠損患者	33.7	33.1	0.99	—
LA陽性患者ADI	36.9	39.7	1.11	+
LA陽性患者GK1	40.1	48.7	1.25	+
LA陽性患者GK2	38.8	49.4	1.31	+
LA陽性患者GR1	37.6	47.8	1.31	+
LA陽性患者GR2	51.7	54.4	1.09	+

【0024】

【発明の効果】

本発明は、低濃度のホスファチジルセリン（PS）を少なくとも含む試薬と高濃度のPSを少なくとも含む試薬との2種類の試薬からなる凝固測定試薬および当該試薬を用いることを特徴とする凝固測定方法を提供する。本発明は、従来法と比較して、天然由来リン脂質の不均一性または抽出変動差の凝固時間への影響が解消されており、精度が高く且つ安定して結果が得られるという利点がある。また、本発明手法によれば、ヘパリンなどの抗凝固剤を含有した検体がグループス

アンチコアグラント (LA) 陽性患者血漿と同様に陽性と判定されることがなく、陰性荷電リン脂質である PS 依存的な LA の反応を、従来法とは格段の差異をもって、特異的に且つ高感度に検知することが可能である。すなわち、本発明によれば、血液凝固異常を引き起こす血液凝固関連因子の異常、例えば LA の存在が精度高く且つ特異的に検出できるため、臨床検査の分野や血液凝固系の研究分野において極めて有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡便で且つ精度の高いリン脂質依存性凝固試験を提供すること、さらに詳しくはループスアンチコアグラントの特異的且つ精度の高い測定方法および当該測定方法に用いる試薬を提供すること。

【解決手段】 低濃度のホスファチジルセリン（1乃至5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を少なくとも含む試薬と、高濃度のホスファチジルセリン（20乃至50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を少なくとも含む試薬との、2種類の試薬（ホスファチジルセリンの濃度比が10乃至20倍）からなる凝固測定試薬および当該試薬を用いることを特徴とする凝固時間測定方法を提供する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-216782
受付番号	50201097905
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成14年 7月26日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 7月25日
-------	-------------

特願 2002-216782

出願人履歴情報

識別番号

[390014960]

1. 変更年月日
[変更理由]

1998年10月 7日

名称変更

住所変更

住 所
氏 名

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
シスメックス株式会社